

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08844

研究課題名(和文) 化学療法誘発性の末梢神経障害に対する遺伝子治療の有用性に関する研究

研究課題名(英文) Usefulness of gene therapy for peripheral neuropathy

研究代表者

川田 大輔 (KAWATA, DAISUKE)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：30595773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：痛み治療として複製欠損型ウイルスベクターを投与することによる遺伝子治療の有用性と鎮痛メカニズムを検討した。本研究では、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)67を発現させ脊髄後角の-アミノ酪酸(GABA)合成を促進するウイルスベクターを用いた遺伝子治療の有用性を明らかにし、その鎮痛機序を解明した。研究成果として、末梢神経障害性の疼痛モデルに対するヘルペスウイルスベクターの有用性と鎮痛機序の一部を明らかにすることが出来た。加えて、GABA産生を促進するアデノ随伴ウイルスベクターを作製し、細胞レベルにおいてその機能が果たされていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までの我々の報告と本研究の成果を踏まえ、さらに痛みの遺伝子治療と神経障害性疼痛のメカニズムの解明を継続して行っていくことで、ウイルスベクターを用いた新しい痛みの遺伝子治療の開発と臨床応用に繋げることが可能になると考える。本研究の成果は、神経障害のメカニズムを解明し、将来的には末梢神経障害患者の疼痛治療に繋がる可能性をもつものであり、疼痛患者のQOLの向上と、疼痛治療の成績向上に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the usefulness and analgesic mechanism of gene therapy by administering a replication-deficient viral vector as a pain treatment. In this study, we clarified the usefulness of gene therapy using a virus vectors that expresses glutamate decarboxylase (GAD)67 and promotes -aminobutyric acid (GABA) synthesis in the dorsal horn of the spinal cord, and elucidated its pain-relieving mechanism. As a result of the research, we were able to clarify the usefulness of the herpesvirus vector for the pain model of peripheral neuropathy and a part of the analgesic mechanism. In addition, we created an adeno-associated virus vector that promotes GABA production and showed that it fulfills its function at the cellular level.

研究分野：疼痛分野、遺伝子治療

キーワード：疼痛治療 ウイルスベクター 遺伝子治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1970年代、遺伝子治療は様々な疾患に対する究極の治療法としてその発想が生まれ、1990年にはアデノシン・デアミナーゼ欠損症を対象とした世界で初めて遺伝子治療の臨床試験が行われた。その後の活発な研究によって、遺伝子治療の新規治療法としての参入が行われ、いくつかの分野では既に遺伝子治療が開始されているが、痛みの分野における遺伝子治療の有効性は明らかにされておらず、実用化までには至っていない。

上記の背景より、遺伝子治療を含めた新規の痛みの治療法の開発は急務である。そこで我々は今までに、遺伝子治療が痛みの治療として有効であり、鎮痛機序を明らかにする研究を進め、報告してきた。

これらの報告の中で申請者は、インターロイキン-10 (IL-10)およびニューロトロピン-3 (NT-3)を発現するヘルペスウイルスベクターを用いた遺伝子治療により、脊髄後角で IL-10 と NT-3 を over expression させ、パクリタキセルによって引き起こされたラットの末梢神経障害を抑える効果があることを明らかにした。

・ Daisuke Kawata, Zetang Wu. Regulatable Transgene Expression for Prevention of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development Vol. 6 September 2017

また、本研究の研究分担者らは、痛みの遺伝子治療に関する以下の研究成果を報告している。

- ・ Kanda H, Kanao M, et al. Gene Ther. 2016
- ・ Kanao M, et al. Anesth Analg. 2015
- ・ Kanda H, et al. Anesth Analg. 2016
- ・ Kanda H, Liu S, Kanao M, et al. Transl Perioper Pain Med. 2017

2. 研究の目的

これまでの我々の研究をさらに発展させ、痛み治療として複製欠損型ウイルスベクターを投与することによる遺伝子治療の有用性と鎮痛メカニズムを検討する。

本研究では、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) 67 を発現させ脊髄後角の γ -アミノ酪酸 (GABA) 合成を促進するウイルスベクターを用いた遺伝子治療の有用性を明らかにし、その鎮痛機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

我々は、当初の研究計画として、アメリカのミシガン大学と本学との間に MTA を締結させた後、ミシガン大学よりグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) 67 を発現させるヘルペスウイルスベクターを継続して譲り受け、本研究へ使用する予定であった。しかしながら、COVID-19 の世界的流行によってアメリカからのヘルペスウイルスベクターの供給が途絶えてしまったため、研究計画の一部を変更 (下記) せざるを得なくなった。

[当初の研究計画からの変更点]

- ・細胞実験で使用するウイルスベクターをヘルペスウイルスに加えて、アデノ随伴ウイルスを追加すること (発現遺伝子の変更はなし)
 - ・本研究で使用するアデノ随伴ウイルスベクターを自前で作製すること
 - ・我々が作製したアデノ随伴ウイルスベクターの機能評価を行うこと
- 以下に、変更後の研究方法を示す。

(1) アデノ随伴ウイルスベクターの作製

緑色蛍光タンパク質 (GFP) もしくはグルタミン酸デカルボキシラーゼ 1 (GAD1) を、サイトメガロウイルス (CMV)、シナプシン I (SYN) または CMV エンハンサー融合 SYN (E/SYN) プロモーター制御下で発現する AAV ベクターを作製した。

【アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの作製手順】

pENN. AAV. cTNT. PI. eGFP. WPRE. rBG をバックボーンとして、以下のプロモーターおよび cDNA の組み合わせで作製した 6 種類の AAV トランスファープラスミド (pAAV) から以下の手順で AAV ベクターを作製した。

プロモーター : SYN, ESYN, CMV

cDNA : GAD67, EGFP

- ① プロモーター、cDNAをpAAVに乗せ換える。なお、バックボーン、プロモーター、cDNAは制限酵素法またはPCRクローニングで作製する。pAAVをコンピテント細胞(DH5a)に導入し増幅する(P1レベル)。
- ② 上記pAAVとともに、大腸菌で増幅後に精製したヘルパープラスミド(pAdDeltaF6)、パッキングプラスミド(pAAV2/9n)を共に293細胞株に導入し、AAVを産生する。
- ③ 培養液中で293細胞を破壊し、AAVを回収する。
- ④ 回収したAAVのウイルスはPEG沈降/CsCl₂密度勾配遠心法または市販のキットで濃縮する。ウイルス濃縮のための超遠心機は、実験実習機器センター遠心機室の機器を使用する。パッキングされたウイルスゲノム数をqPCRで定量し、タイターを測定する。

(2) ラット初代脳細胞を用いたウイルスベクターの機能評価

妊娠 17 日目のラット胎児から脳細胞の初代培養を確立し、免疫染色により神経細胞の純度を確認した。

次に、GAD67 または GFP(コントロール)を発現する AAV を primary brain neuron へ感染させ (P1 レベル)、PCR 法、ウエスタンブロット法、免疫染色法を用いて GAD67 の over expression を確認し、質量分析法を用いて GABA の定量を行った。

リアルタイム Rt-PCR 法を用いて AAV 投与によって、GAD67 が増加していることを確認するため、採取した検体に対してリアルタイム qRT-PCR 法を行う。市販の RNA 抽出キット、ビーズ破砕型のホモジナイザーを用いて RNA を抽出後、reverse transcriptase によって cDNA を作製する。特異的なプライマーと Taqman プローブ検出によるリアルタイム qRT-PCR を行い、GAPDH をハウスキーピング遺伝子とし、GAD67 の発現を確認した。リアルタイム qRT-PCR の解析機器は大学保有の現有機を使用することが可能である。

(3) 神経障害性疼痛モデルの作製と動物行動評価

末梢神経障害性疼痛モデルを用い、機械刺激性アロディニアの経時的变化を明らかにした。アロディニアの刺激閾値は、von Frey フィラメントを使用して測定した。底面が網目となった透明な容器にラットを入れ、30 分以上かけて環境順化させた。

疼痛陽性反応は、フィラメントによって後肢測定に刺激を受けた際に、足をひっこめる動作もしくは足を舐める動作が見られた場合とした。常に陽性反応が見られた場合、次はより小さいフィラメントによる刺激を適用し、常に陰性反応の場合は、反対に一段階大きい力による刺激を与えた。

(4) ウイルスベクターを用いた GAD67 を標的とする遺伝子治療

疼痛モデルラット作製から 1 週間後に、ヘルペスウイルスベクター”QHGD67”もしくは、コントロールベクター”Q0ZHG”を 1.0×10^9 pfu 含む 30ul を足底部へ皮下注射した。機械刺激性アロディニアと温熱性痛覚過敏反応を経時的に計測し、”QHGD67”の治療効果を検討した。経時的計測により、治療効果が最大となる時点と治療持続期間が明らかとなった。足底部にウイルスベクターを注入すると、ベクターは皮下から 1 次ニューロンに移行し、神経線維を上行して後根神経節の 1 次ニューロンに形質導入を行う。

本研究で用いるウイルスベクターは、単純ヘルペスウイルスベクターのひとつであり、”QHGD67”は GAD67 遺伝子をコードする。GAD67 遺伝子はシナプス前神経における GABA 合成に重要な酵素である GAD67 をコードしている。

(5) GAD67 を標的とした遺伝子治療による GABA 合成への影響

GAD67 を標的としたウイルスベクター投与により、後根神経節の 1 次ニューロンで形質導入された GAD67 遺伝子をもとに GAD67 タンパク質の発現が DRG において促進することを確認した。GAD67 の発現は、Western Blot 法を用いて評価した。

ウイルスベクターの治療効果が最大と考えられる時点で、第 4-5 腰神経が起始する脊髄後角を採取した。検体組織を、蛋白溶解バッファーを使用して均質化し、その蛋白溶解バッファーはプロテアーゼ阻害薬とフォスファターゼ阻害薬を含むものとする。ホモジネートを 18000g, 摂氏 4 度で 20 分間遠心分離し、その上澄みを収集し、蛋白定量を行う。30ug ずつ蛋白を分注し、Laemmli buffer を加え、次に 95 度で 5 分間、蛋白変性させる。蛋白を、10-12%の gel を用いて電気泳動により展開した後、PVDF メンブレンに転写する。メンブレンはスキムミルクを用いてブロッキングし、そののち一次抗体を含んだ溶液中に摂氏 4 度で 1 晩、振盪させる。一次抗体は、rabbit anti-GAD67、ハウスキーピングとして mouse anti- β -actin を使用する。メンブレンを 2 次抗体に浸し、次に chemiluminescence solution を用いて検出する。得られたバンドは ImageJ を用いて解析する。Western blot の解析機器は大学保有の現有機を使用することが可能である。

(6) ウイルスベクターを用いた遺伝子治療の免疫関連因子/炎症性メディエーターへの影響

DRG および脊髄後角をサンプルとし Western Blot 法を用い、痛みの慢性化に関わる活性化免疫系細胞から放出される炎症性メディエーターの TNF- α の発現を調査し、この蛋白発現にウイルスベクターが与える影響を明らかにした。

4. 研究成果

ラット初代培養脳細胞において、神経細胞の純度 (TuJ-1 陽性細胞率) は 86.9% であった。

GAD1 を発現する AAV ベクター (AAV-CMV-GAD1、AAV-SYN-GAD1、AAV-E/SYN-GAD1) の投与は、コントロールベクター (AAV-GFP-CMV) と比較してラット初代培養脳細胞における GAD1 遺伝子発現を優位に増加させた。

培養液中に含まれる GABA 量はそれぞれ 3623.5ng/ml、2563.7ng/ml、3083.8ng/ml であり、コントロール (67.6ng/ml) のものと比較して著しく上昇していた。AAV ベクターを用いた GAD1 遺伝子の導入は、ラット初代培養脳細胞の GABA 産生を促進した。GABA 産生を促進するアデノ随伴ウイルスベクターを作製し、細胞レベルにおいてその機能が果たされていることが示された。

ラット末梢神経障害性疼痛モデルに GAD67 を発現するヘルペスウイルスベクターを投与すると、神経障害性疼痛が緩和されることを確認した。その分子生物学的メカニズムには、脊髄後角/DRG の GAD67 が増加して GABA 合成が促進すること、脊髄後角の TNF- α 放出が抑制されることが関与することを見出した。

当初の研究計画からの変更はあったものの、上記のように本研究によって神経障害性疼痛に対するウイルスベクターの有用性と鎮痛機序の一部を明らかにすることが出来た。

今後も、本研究の成果を踏まえてさらに発展させて進めていき、神経障害性疼痛のメカニズムの解明も併せて行っていくことで、ウイルスベクターを用いた新しい痛みの遺伝子治療の開発と臨床応用に繋げることが可能になると考える。

◆本研究の研究成果の開示◆

本研究により、我々が作製した AAV ベクターを用いた GAD1 遺伝子の導入は、ラット初代培養脳細胞の GABA 産生を促進させたことが明らかになった。以下の学会発表によって本研究の成果を報告した。

2020.12.1-2021.3.31 日本ペインクリニック学会 第1回北海道支部学術集会 (Web 開催)

演題名: γ アミノ酪酸の産生を亢進させるアデノ随伴ウイルスベクターの作成

筆頭演者: 神田 恵¹、共同演者: 小山 恭平²、河村 あさみ¹、川田 友美¹、川田 大輔³、奥田 勝博⁴、神田 浩嗣¹

所属: 1 旭川医科大学 麻酔・蘇生学講座、2 旭川医科大学 外科学講座心臓大血管外科学分野、

3 旭川医科大学 救急医学講座、4 旭川医科大学 法医学講座

神経障害性疼痛を緩和するウイルスベクターを用いた遺伝子治療の効果とそのメカニズム解明に関して、本研究により得られた成果と、我々が今まで得た一連の成果を併せ、以下の論文によって知見を開示した。

Kanao-Kanda M, Kanda H, et al.

Viral Vector-Mediated Gene Transfer of Glutamic Acid Decarboxylase for Chronic Pain Treatment: A Literature Review.

Human Gene Therapy. 2020 Feb 11. doi: 10.1089/hum.2019.359. PMID:32041431

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanao-Kanda M, Kanda H, Liu S, Roy S, Toborek M, Hao S.	4. 巻 31
2. 論文標題 Viral Vector-Mediated Gene Transfer of Glutamic Acid Decarboxylase for Chronic Pain Treatment: A Literature Review.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 405-414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/hum.2019.359.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Megumi Kanao-Kanda
2. 発表標題 Peripheral role of anti-allodynia produced by HSV vectors mediating GAD67 in HIV-related neuropathic pain in rats
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologists anural meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神田 患
2. 発表標題 アミノ酪酸の産生を亢進させるアデノ随伴ウイルスベクターの作成
3. 学会等名 日本ペインクリニック学会 第1回北海道支部学術集会（Web開催）
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	神田 浩嗣 (KANDA HIROTSUGU) (00550641)	旭川医科大学・医学部・准教授 (10107)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	神田 恵 (KANDA MEGUMI) (50516820)	旭川医科大学・医学部・講師 (10107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関